



TITLE:

Studies on coenzyme and amino acid biosynthesis in hyperthermophilic archaea(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Hachisuka, Shinichi

CITATION:

Hachisuka, Shinichi. Studies on coenzyme and amino acid biosynthesis in hyperthermophilic archaea. 京都大学, 2018, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2018-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21276>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要旨は2018-08-23に公開

京都大学	博士（工学）	氏名	蜂 須 賀 真 一
論文題目	Studies on coenzyme and amino acid biosynthesis in hyperthermophilic archaea (超好熱性アーキアにおける補酵素およびアミノ酸生合成に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、超好熱性アーキアにおける補酵素およびアミノ酸の生合成に関する課題の解決を目標とし、様々な酵素の遺伝学的・生化学的な解析を通じて未同定であった生命機構を解明した結果をまとめたものである。その構成は、序論、本編 4 章、結論から成る。</p> <p>序論では、アーキアの分類、超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakarensis</i> の性質・遺伝子組換え技術、補酵素ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) の生合成経路、アミノ酸プロリン (Pro) の生合成経路、補酵素リボ酸の生合成経路および本論文の意義等がまとめられている。</p> <p>第 1 章では、超好熱性アーキアにおいても酸化還元反応の補酵素として用いられている NAD⁺が高温で分解することに着目し、<i>T. kodakarensis</i> における NAD⁺の熱分解に対応する機構を明らかにした。まず本菌の至適生育温度である 85℃における NAD⁺の熱分解産物が ADP リボースおよびニコチンアミドであることを確認し、本章ではまず ADP リボースの代謝について述べている。ADP リボースを代謝する酵素を本菌のゲノム上で探索したところ、その候補として ADP リボースピロホスファターゼ (ADPR-PPase) と推定される TK2284 遺伝子を見出した。ADPR-PPase は一般に、ADP リボースをリボース 5-リン酸 (R5P) と AMP に加水分解する酵素である。そこで TK2284 組換え型タンパク質を調製し、ADP リボースを含む様々なヌクレオシド二リン酸誘導体に対して基質特異性を検討した結果、ADP リボースおよび ADP グルコースに対して有意な活性を示した。続いてこれら 2 つの基質に対して速度論的解析を行ったところ、ADP リボースに対する k_{cat}/K_m 値は ADP グルコースのそれよりも約 53 倍高い値を示し、TK2284 タンパク質の生理的基質が ADP リボースであることが示唆された。さらに、TK2284 遺伝子破壊株を作製し、アミノ酸合成培地（栄養制限培地）における増殖を測定した結果、宿主株と比べて最高到達濁度が低くなり、栄養制限条件下では TK2284 タンパク質によって代謝された R5P や AMP が再利用されている可能性が示唆された。R5P はホスホリボシル二リン酸 (PRPP) を経て様々な代謝経路で利用され得るが、その 1 つには NAD⁺生合成経路があり、NAD⁺の再生に寄与している可能性もある。</p> <p>第 2 章では、ADP リボースとは別の NAD⁺熱分解産物であるニコチンアミドの代謝について述べている。ニコチンアミドから NAD⁺を再生する経路には、一般に 2 つの経路が知られている。1 つは 2 ステップ経路と呼ばれ、ニコチンアミドが PRPP を基質に用いてホスホリボシル化されることでニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) に変換され、続いて ATP を基質としてアデニル化されて NAD⁺が再生される経路である。もう 1 つの経路は 4 ステップ経路と呼ばれ、ニコチンアミドが一度脱アミド化されてニコチン酸となり、その後ホスホリボシル化およびアデニル化によりニコチン酸モノヌクレオチド (NaMN) を経てニコチン酸アデニンジヌクレオチドへ変換され、最後に再びアミド化されることで NAD⁺が再生される経路である。<i>T. kodakarensis</i> のゲノム上には 4 ステップ経路を構成する遺伝子が全て存在する一方で、アデニルトランスフェラーゼ:TK0067 タンパク質が NaMN だけでなく 2 ステップ経路の代謝中間産物である NMN に対しても活性を示すことがわかっていたため、4 ステップ経路に加えて 2 ステップ経路も利用している可能性が考えられた。そこで、本菌においてニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼと推定されている TK1676 の組換え型タンパク質</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	蜂 須 賀 真 一
<p>がニコチン酸だけでなくニコチンアミドも認識するのかを調べたところ、ニコチン酸に対し活性を示す条件でニコチンアミドに対してはほとんど活性を示さなかった。また、デノボ経路を構成するキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (TK0218) とサルベージ経路のうち 4 ステップ経路のみに関与するニコチンアミドデアミダーゼ (TK1650) を共に破壊した ΔTK0218ΔTK1650 株を作製した。本破壊株は合成培地において、ニコチンアミドの添加では生育できず、ニコチン酸の添加によってのみ生育可能であったことから、本菌は 4 ステップ経路を利用し、2 ステップ経路は利用していないことが明らかとなった。</p> <p>第 3 章では、Pro の生合成に関わる遺伝子の同定について述べている。<i>T. kodakarensis</i> のゲノム解析において γ-アミノ酪酸 (GABA) アミノトランスフェラーゼと推定されていた TK2101 が、その生化学的解析により GABA に対してはほとんど活性を示さず、オルニチン (Orn) やリジンに対して高いアミノトランスフェラーゼ活性を示すことがわかった。特に Orn をアミノ基供与体に、2-オキシグルタル酸をアミノ基受容体に用いた際に最も高い k_{cat}/K_m 値を示した。そこで、本遺伝子が生体内でも Orn アミノトランスフェラーゼとして機能するならば、Orn から Pro を生合成する経路に関わる可能性があると考えた。しかしながら、当研究室におけるこれまでの培養実験から、本菌は Pro 生合成能を持たないと考えられていたため、まず本菌の Pro 生合成能を再検討した。その結果 Pro を除いたアミノ酸合成培地において、大幅な増殖遅延が観察されたものの、本菌が増殖できることを見出した。そこで、Pro 含有および Pro 非含有アミノ酸培地における TK2101 遺伝子破壊株の増殖特性を調べた。その結果、TK2101 遺伝子破壊株は Pro 含有培地では生育したものの、Pro 非含有培地では生育できなかった。また、Pro 非含有培地に Orn を加えると、宿主株では生育遅延が緩和されたが、破壊株の生育は回復しなかった。よって、TK2101 遺伝子が本菌において Orn から Pro を生合成する経路に関わることが明らかとなった。</p> <p>第 4 章では、リポ酸の生合成に関わる遺伝子の同定について述べている。<i>T. kodakarensis</i> のゲノム上には、種々のビタミンの生合成に関与すると推定される遺伝子が存在する。しかしながらこれらの中には個々の経路の残りの遺伝子の大部分が本菌においては保存されておらず、ビタミンの生合成とは異なる代謝機能を示す可能性が示唆されているものもある。これらの内の 2 種に着目し、比較ゲノム解析を行った結果、これらの遺伝子がともにリポ酸の代謝に関わる可能性が示唆された。そこで、両遺伝子の破壊株を作製し、一般にリポ酸を補酵素として利用するグリシン開裂系の構成因子 H-タンパク質の破壊株が生育できないセリン非添加培地を基に、リポ酸添加・非添加条件における増殖特性を調べた。その結果、それぞれの遺伝子を破壊した株および両遺伝子とも破壊した二重破壊株の計 3 株が全てセリンを除いたアミノ酸培地でリポ酸要求性を示し、両遺伝子がともにリポ酸生合成に関与することが示された。</p> <p>結論では、まず本論文で得られた成果について要約し、それらの普遍性について論じている。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を研究題材とし、超好熱性アーキアの補酵素およびアミノ酸の生合成における種々の未同定の課題の解決を目標とした研究であり、得られた主な成果は次の通りである。

1. *T. kodakarensis* が生育する 85℃において、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) がニコチンアミドと ADP リボースに分解することを確認した。組換え型タンパク質の生化学的解析を通じて、ADP リボースを代謝可能なリボース 5-リン酸および AMP に加水分解する ADP リボースピロホスファターゼを同定した。また、遺伝子破壊株の増殖実験により本酵素が栄養制限下の条件で増殖に寄与している可能性を示した。
2. もう 1 つの NAD⁺熱分解産物であるニコチンアミドを NAD⁺に再生する経路として、*T. kodakarensis* はニコチンアミドの脱アミド化を介する 4 ステップ経路と呼ばれる経路を用いていることを、組換え型タンパク質の解析および遺伝子破壊株の増殖実験により明らかにした。
3. *T. kodakarensis* の γ -アミノ酪酸 (GABA) アミノトランスフェラーゼホモログが GABA に対してはほとんど活性を示さず、オルニチンに対して特に高い活性を示し、オルニチンからプロリンを生合成する経路上で機能することを、生化学的・遺伝学的な手法によって明らかにした。
4. *T. kodakarensis* のセリン代謝にはグリシン開裂系が関与することがわかっているが、その機能に必要な補酵素であるリポ酸の生合成に関わる 2 つの遺伝子を、比較ゲノム解析や遺伝学的解析などにより同定した。

以上のように、本論文は超好熱性アーキアに分類される微生物の生命機構における基盤的知見を著しく向上させたものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 30 年 4 月 18 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、無期限に当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日： 平成 30 年 8 月 23 日以降